

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

20.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 9 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 1 0 6 3 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 1 0 6 3 7]

出 願 人 富 士 写 真 フ ィ ル ム 株 式 有 限 公 司
Applicant(s):

REC'D. 09 DEC 2004

WIPO

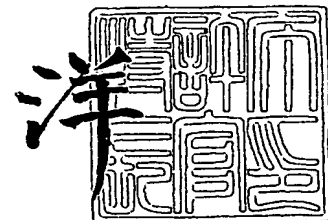
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 2 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P046905
【提出日】 平成15年12月 9日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C07H 1/08
C07H 21/04

【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 丁目 1 1 番 4 6 号 富士写真フイルム株式会社内
【氏名】 森 寿弘

【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 丁目 1 1 番 4 6 号 富士写真フイルム株式会社内
【氏名】 牧野 快彦

【特許出願人】
【識別番号】 000005201
【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】
【識別番号】 100105647
【弁理士】
【氏名又は名称】 小栗 昌平
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】
【識別番号】 100105474
【弁理士】
【氏名又は名称】 本多 弘徳
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】
【識別番号】 100108589
【弁理士】
【氏名又は名称】 市川 利光
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】
【識別番号】 100115107
【弁理士】
【氏名又は名称】 高松 猛
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】
【識別番号】 100090343
【弁理士】
【氏名又は名称】 栗宇 百合子
【電話番号】 03-5561-3990

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 092740
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0003489

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

(1)核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、(2)洗浄液を該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、核酸が吸着した状態で該多孔性膜を洗浄する工程、及び(3)回収液を該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内から核酸を脱着させる工程を含有する核酸の分離精製方法において、該核酸吸着性多孔性膜が、イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜であって、その平均孔径が $0.9 \sim 5.0 \mu\text{m}$ であることを特徴とする核酸の分離精製方法。

【請求項 2】

上記多孔性膜が、平均孔径 $1.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$ の多孔性膜である、請求項 1 に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 3】

上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を、加圧状態で核酸吸着性多孔性膜に通過させることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 4】

上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、少なくとも二つの開口を有する容器内に該核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を注入し、カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いてカートリッジ内を加圧状態にして、該注入した各液を通過させ、他の開口より排出させることを特徴とする請求項 3 記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 5】

上記核酸を含む試料溶液が、全血を処理したことで得られる試料溶液である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 6】

上記核酸を含む試料溶液が、培養細胞を処理したことで得られる試料溶液である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 7】

上記核酸を含む試料溶液が、動物または植物組織を処理したことで得られる試料溶液である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 8】

上記核酸が、DNA である、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 9】

上記核酸が、RNA である、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 10】

上記多孔性膜が再生セルロースの多孔性膜である、請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 11】

多孔性膜が、表裏非対称性の多孔性膜である、請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 12】

請求項 1 ～ 11 のいずれかに記載の核酸の分離精製方法を行うための、少なくとも二つの開口を有する容器内に、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジ。

【請求項 13】

圧力発生装置が、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱加納に結合されるポンプである請求項 4 に記載の核酸分離精製方法。

【請求項 14】

請求項 1 ～ 11 のいずれかに記載の核酸分離精製方法を行うための、核酸分離精製カートリッジと試薬のキット。

【請求項 15】

請求項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載の核酸分離精製方法を行うための装置。

【書類名】明細書

【発明の名称】核酸の分離精製方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸を分離精製する方法に関する。より詳細には、本発明は、核酸を分離精製するために、検体から核酸を含む試料溶液を得る方法に関する。さらに詳しくは、得られた核酸を含む試料溶液を用いて、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力発生装置を用いて、核酸を含む試料から核酸を分離精製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸は、様々な分野で種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形状で用いることを要求する。

【0003】

診断分野においても、核酸は種々の方法で用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さらに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現におよぶ種々の理由により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0004】

多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料の核酸の精製においては、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0005】

広く知られた分離精製方法の一つに、核酸を二酸化珪素、シリカポリマー、珪酸マグネシウム等の固相に吸着させ、引き続く洗浄、脱着等の操作によって分離精製する方法がある（例えば、特許文献1）。この方法は、分離性能としては優れているが、簡便性、迅速性、自動化および小型化適性においては十分でなく、同一性能の吸着媒体の工業的大量生産が困難であり、かつ取扱いが不便で、種々の形状に加工しがたい等の問題点がある。

【0006】

また、簡便かつ効率よく核酸を分離精製する方法の一つとして、固相に核酸を吸着させる溶液及び固相から核酸を脱着させる溶液をそれぞれ用いて、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させることによって、核酸を分離精製する方法が記載されている（特許文献2）。

【0007】

一方、従来の核酸分離精製法としては、遠心法によるもの、磁気ビーズを用いるもの、多孔性膜を用いるものなどがある。例えば、多孔性膜を用いた核酸分離装置としては、多孔性膜を収容した多孔性膜をラックに多数セットし、これに核酸を含む試料液を分注し、上記ラックの底部の周囲をシール材を介してエアチャンバーで密閉して内部を減圧し、全多孔性膜チューブを同時に排出側より吸引し試料液を通過させて核酸を多孔性膜に吸着し、その後、洗浄液および回収液を分注して、同様に減圧吸引して洗浄・脱着するようにした機構が提案されている（例えば、特許文献3参照）。

【特許文献1】特公平7-51065号公報

【特許文献2】特開2003-128691号公報

【特許文献3】特許第2832586号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、従来の核酸分離方法では、収率や純度の点で未だ充分ではなく、更なる改良が求められる。特に、多孔性膜を用いた核酸分離方法では、全血、培養細胞、組織などの固形成分が多い試料を前処理して得られた核酸を含む試料溶液を適用すると、多孔性膜を試料溶液が通過する時間が長くなるか、もしくは、多孔性膜が目詰まりするという問題があった。

【0009】

従って、本発明の目的は、検体中の核酸を核酸吸着性の多孔性膜に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させて核酸を分離精製する方法において、核酸の回収量は十分に保ちながら、かつ多孔性膜を試料溶液が通過する時間が長くない、もしくは、多孔性膜が目詰まりしない方法を提供することである。

本発明の更なる目的は、分離性能に優れ、洗浄効率が良く、簡便で、迅速で、自動化および小型化適性に優れ、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である多孔性膜を使用した核酸の分離精製方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、本発明に従い、核酸を多孔性膜に吸着及び脱着させる過程を含む核酸の分離精製方法における上記課題が、従来使用している多孔性膜の孔径が $0.8\mu\text{m}$ 以下と小さいために生じるものであることを見出し、該多孔性膜としてイオン結合が関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜で、かつ平均孔径 $0.9\sim 5.0\mu\text{m}$ の多孔性膜を用いることによって、核酸を含む検体から核酸を迅速に、収率よく分離精製することができることを見出したものである。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。即ち、本発明は、下記の構成よりなるものである。

【0011】

1. (1)核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、
- (2)洗浄液を該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、核酸が吸着した状態で該多孔性膜を洗浄する工程、及び
- (3)回収液を該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内から核酸を脱着させる工程

を含有する核酸の分離精製方法において、該核酸吸着性多孔性膜が、イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜であり、且つ、その平均孔径が $0.9\sim 5.0\mu\text{m}$ であることを特徴とする核酸の分離精製方法。

【0012】

2. 上記多孔性膜が、平均孔径 $1.5\sim 3.5\mu\text{m}$ の多孔性膜である、上記第1項に記載の核酸の分離精製方法。

【0013】

3. 上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を、加圧状態で核酸吸着性多孔性膜に通過させることを特徴とする上記第1項または第2項に記載の核酸の分離精製方法。

【0014】

4. 上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、少なくとも二つの開口を有する容器内に該核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を注入し、カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いてカートリッジ内を加圧状態にして、該注入した各液を通過させ、他の開口より排出させることを特徴とする上記第3項に記載の核酸の分離精製方法。

【0015】

5. 上記核酸を含む試料溶液が、全血を処理したことで得られる試料溶液である、上記第1項～第4項のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。
6. 上記核酸を含む試料溶液が、培養細胞を処理したことで得られる試料溶液である、

上記第1項～第4項のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

7. 上記核酸を含む試料溶液が、動物または植物組織を処理したことで得られる試料溶液である、上記第1項～第4項のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【0016】

8. 上記核酸が、DNAである、上記第1項～第7項のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

9. 上記核酸が、RNAである、上記第1項～第7項のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【0017】

10. 上記多孔性膜が、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る多孔性膜である、上記第1項～第9項のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【0018】

11. アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物がトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物である、上記第10項に記載の核酸の分離精製方法。

12. トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比（質量比）が、99：1～50：50である、上記第11項に記載の核酸の分離精製方法。

【0019】

13. 上記多孔性膜が、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理した有機材料からなる多孔性膜である、上記第1項～第9項のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【0020】

14. アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物の鹸化率が、5%以上である、上記第13項に記載の核酸の分離精製方法。

15. アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物の鹸化率が、10%以上である、上記第13項に記載の核酸の分離精製方法。

【0021】

16. アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理した有機材料が、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物の鹸化物である、上記第13項～第15項のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【0022】

17. トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比（質量比）が、99：1～50：50である、上記第16項に記載の核酸の分離精製方法。

【0023】

18. 上記多孔性膜が再生セルロースの多孔性膜である、上記第1項～第9項のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【0024】

19. 上記多孔性膜が、表裏非対称性の多孔性膜である、上記第1項～第18項のいずれかに記載の核酸の分離精製方法。

【0025】

20. 上記第1項～第20項のいずれかに記載の核酸の分離精製方法を行うための、少なくとも二個の開口を有する容器内に、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジ。

【0026】

21. 上記圧力発生装置が、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱加納に結合されるポンプである上記第3項に記載の核酸分離精製方法。

【0027】

22. 上記第1項～第21項のいずれかに記載の核酸分離精製方法を行うための、核酸分離精製カートリッジと試薬のキット。

【0028】

23. 上記第1項～第22項のいずれかに記載の核酸分離精製方法を行うための装置。

【発明の効果】

【0029】

本発明によれば、効率良く、高純度で、検体中の核酸を核酸吸着性の多孔性膜に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させて核酸を分離精製することができる。更には、本発明の核酸分離精製方法は、分離性能に優れ、洗浄効率が良く、簡便で、迅速で、自動化および小型化適性に優れ、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である。

更に、本発明によれば、核酸の回収量は十分に保ちながら、かつ多孔性膜を試料溶液が通過する時間が長くない、もしくは、多孔性膜が目詰まりしないように処理でき、かつ、小型化が可能な、核酸分離精製装置を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0030】

本発明の核酸分離精製方法は、(1)核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、(2)該核酸吸着性多孔性膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、及び(3)回収液を、該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内から核酸を脱着させる工程を少なくとも含むものである。

【0031】

好ましくは、上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を、加圧状態で核酸吸着性多孔性膜に通過させるものであり、より好ましくは、上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、少なくとも二個の開口を有する容器内に該核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を注入し、カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いてカートリッジ内を加圧状態にして、該注入した各液を通過させ、他の開口より排出させるものである。核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を加圧状態で上記多孔性膜に通過させることにより、装置をコンパクトに自動化することができ、好ましい。加圧は、好ましくは10～200kpa、より好ましくは40～100kpaの程度で行われる。

【0032】

上記の核酸分離精製の工程では、最初の核酸を含む試料液を注入から核酸分離精製カートリッジ外に核酸を得るまでの工程を5分以内、好適な状況では2分以内で終了することが可能である。また、上記の核酸分離精製の工程では核酸を検体中に含まれる全量に対して50質量%以上、好適な状況では90質量%以上の収率で得る事が可能である。

【0033】

また、上記の核酸分離精製の工程では、1kbpから200kbp、特に20kbpから140kbpと広範囲に及ぶ分子量の核酸を回収することができる。すなわち、従来行なわれているガラスフィルターを用いたスピンカラム法（キアゲン社）に比べて、長鎖の核酸を回収できる。

【0034】

また、上記の核酸分離精製の工程では、紫外可視分光光度計での測定値(260nm/280nm)が、DNAの場合は1.6～2.0、RNAの場合は1.8～2.2となる純度を持つ核酸を回収することができ、不純物混入量の少ない高純度の核酸を定常的に得ることができる。さらには、紫外可視分光光度計での測定値(260nm/280nm)がDNAの場合は1.8付近、RNAの場合は2.0付近となる純度を持つ核酸を回収することができる。

【0035】

また、上記工程において、圧力差発生装置としては、注射器、ピペット、あるいはペリスタポンプのような加圧が可能なポンプ等、或いは、エバポレーター等の減圧可能なものが挙げられる。これらの内、手動操作には注射器が、自動操作にはポンプが適している。また、ピペットは片手操作が容易にできるという利点を有する。好ましくは、圧力差発生装置は、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱可能に結合されている。

【0036】

本発明において使用できる検体に制限はないが、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物（又はその一部）、動物（またはその一部）、細菌、ウイルスなど、あるいはそれらの溶解物およびホモジネートなどの生物材料から調製された溶液が対象となる。特に、全血、培養細胞、組織などの固形成分が多い生物材料から調整された溶液が対象になる。

【0037】

最初にこれらの検体について細胞膜および核膜等を溶解して核酸を可溶化する試薬を含む水溶液（核酸可溶化試薬）で処理する。これにより細胞膜および核膜が溶解されて、核酸が水溶液内に分散し、核酸を含む試料溶液を得る。

【0038】

細胞膜および核膜を溶解して、核酸を可溶化するためには、例えば、対象となる試料が全血の場合、赤血球の除去、(2) 各種タンパク質の除去、及び(3) 白血球の溶解及び核膜の溶解が必要となる。赤血球の除去および(2) 各種タンパク質の除去は、膜への非特異吸着および多孔性膜の目詰まりを防ぐために、(3) 白血球の溶解及び核膜の溶解は、抽出の対象である核酸を可溶化させるためにそれぞれ必要となる。特に、(3) 白血球の溶解及び核膜の溶解は重要な工程であり、本発明の方法では、この工程により核酸を可溶化することが必要である。

【0039】

核酸を含む検体は、単一の核酸を含む検体でもよいし、異なる複数種類の核酸を含む検体でもよい。回収する核酸の種類は、DNAやRNA等、特に制限されない。検体の数は一つでも複数（複数の容器を用いての複数の検体の並列処理）であってもよい。回収する核酸の長さも特に限定されず、例えば、数bp～数Mbpの任意の長さの核酸を使用することができる。取扱い上の観点からは、回収する核酸の長さは一般的には、数bp～数百kb程度である。

本発明の核酸分離精製方法は、従来の簡易的な核酸分離精製方法より比較的長い核酸を迅速に取り出すことができ、好ましくは50kbp以上、より好ましくは70kbp、更に好ましくは100kbp以上の核酸を回収することに用いることができる。攪拌及びピペティングを穏やかにすることが、より長いDNAを回収する点で好ましい。

【0040】

以下に、細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程について説明する。本発明で、細胞膜および核膜を溶解して核酸を可溶化するには、核酸可溶化試薬を用いる。核酸可溶化試薬としては、カオトロピック塩、界面活性剤およびタンパク質分解酵素を含む溶液が挙げられる。

【0041】

細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る方法としては、(I)細胞又はウイルスを含む検体を容器に注入する工程、(II)上記容器に、カオトロピック塩と界面活性剤を含む核酸可溶化試薬溶液を添加し、検体と核酸可溶化試薬溶液を混合する工程、(III)上記で得られた混合液をインキュベートする工程、(IV)インキュベートされた混合液に水溶性有機溶媒を添加する工程を含む方法を挙げることができる。

【0042】

上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、検体をホモジナイズ処理することで、自動化処理適正が向上する。ホモジナイズ処理は、例えば、超音波処理、鋭利な突起物を用いる、高速攪拌処理を用いる、微細空隙から押し出す処理、ガラスビーズを用いる処理等で行うことができる。

【0043】

また、上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、タンパク質分解酵素を含む核酸可溶化試薬を使用することにより、核酸の回収量及び回収効率が向上し、必要な核酸を含む検体の微量化及び迅速化が可能となる。

【0044】

タンパク質分解酵素は、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼなどから、少なくとも1つのタンパク質分解酵素を好ましく用いることができる。また、タンパク質分解酵素は、複数種以上のタンパク質分解酵素の混合物も好ましく用いることができる。

セリンプロテアーゼとしては、特に限定されず、例えばプロテアーゼKなどを好ましく用いることができる。システインプロテアーゼとしては、特に限定されず、例えばパパイン、カテプシン類などを好ましく用いることができる。金属プロテアーゼとしては、特に限定されず、例えばカルボキシペプチターゼ等を好ましく用いることができる。

タンパク質分解酵素は、添加時の反応系全容積1mlあたり好ましくは0.001IU～10IU、より好ましくは0.01IU～1IUの濃度で用いることができる。

【0045】

また、タンパク質分解酵素は、核酸分解酵素を含まないタンパク質分解酵素を好ましく用いることができる。また、安定化剤を含んだタンパク質分解酵素を好ましく用いることができる。安定化剤としては、金属イオンを好ましく用いることができる。具体的には、マグネシウムイオンが好ましく、例えば塩化マグネシウムなどの形で添加することができる。タンパク質分解酵素の安定化剤を含ませることにより、核酸の回収に必要なタンパク質分解酵素の微量化が可能となり、核酸の回収に必要なコストを低減することができる。

タンパク質分解酵素の安定化剤は、反応系全量に対して好ましくは1～1000mM、より好ましくは10～100mMの濃度で含有することが好ましい。

【0046】

タンパク質分解酵素は、予めカオトロピック塩、界面活性剤等のその他の試薬とともに混合されて1つの試薬として核酸の回収に供されても良い。

また、タンパク質分解酵素は、カオトロピック塩、界面活性剤等のその他の試薬とは個別の2つ以上の試薬として供されても良い。後者の場合、タンパク質分解酵素を含む試薬を先に検体と混合した後に、カオトロピック塩、界面活性剤を含む試薬と混合される。また、カオトロピック塩、界面活性剤を含む試薬を先に混合した後に、タンパク質分解酵素を混合してもよい。

また、タンパク質分解酵素を検体または、検体とカオトロピック塩、界面活性剤を含む試薬との混合液に、タンパク質分解酵素保存容器から直接目薬状に滴下させることもできる。この場合、操作を簡便にすることができる。

【0047】

核酸可溶化試薬は、乾燥された状態で供給されることも好ましい。また、凍結乾燥のように乾燥された状態のタンパク質分解酵素を予め含む容器を用いることができる。上記の、乾燥された状態で供給される核酸可溶化試薬、および乾燥された状態のタンパク質分解酵素を予め含む容器の両方を用いて、核酸を含む試料溶液を得ることもできる。

上記の方法で核酸を含む試料溶液を得る場合、核酸可溶化試薬およびタンパク質分解酵素の保存安定性が良く、核酸収量を変えずに操作を簡便にすることができる。

【0048】

検体とカオトロピック塩および界面活性剤を含む核酸可溶化試薬溶液とを混合する方法は、特に限定されない。

混合する際、攪拌装置により30から3000rpmで1秒から3分間混合することができる。これにより、分離精製される核酸収量を増加させることができる。または、転倒混和を5から30回行うことで混合することも好ましい。また、ピペッティング操作を、10から50回行うことによっても混合することができる。この場合、簡便な操作で分離精製される核酸収量を増加させることができる。

【0049】

検体とカオトロピック塩および界面活性剤を含む核酸可溶化試薬溶液との混合液を、タンパク質分解酵素の至適温度および反応時間でインキュベートすることにより、分離精製される核酸の収量を増加させることができる。インキュベーション温度は、通常20℃～7

0℃、好ましくはタンパク分解酵素の至適温度であり、インキュベーション時間は通常1～90分、好ましくはタンパク分解酵素の至適反応時間である。インキュベーション方法は特に限定されず、湯浴や加温器に入れることで行うことができる。

【0050】

上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、界面活性剤とカオトロピック塩を含む核酸可溶化試薬溶液は、好ましくはpH5～10、より好ましくはpH6～9、さらに好ましくはpH7～8のものが用いられる。

【0051】

また、上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、カオトロピック塩の核酸可溶化試薬溶液における濃度は、0.5M以上であることが好ましく、より好ましくは0.5M～4M、さらに好ましくは、1M～3Mである。上記カオトロピック塩としては、塩酸グアニジンが好ましいが、他のカオトロピック塩（イソチオシアン酸グアニジン、チオシアン酸グアニジン）を使用することもできる。また、これらの塩は単独または複数組み合わせ用いてもよい。

【0052】

また、上記の核酸可溶化試薬溶液は水溶性有機溶媒を含んでいても良い。この水溶性有機溶媒としてはアルコールが好ましい。アルコールは、1級アルコール、2級アルコール、3級アルコールのいずれでも良い。アルコールがメチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール及びその異性体、ブチルアルコール及びその異性体を好ましく用いることができる。これらの水溶性有機溶媒は単独または複数組み合わせ用いてもよい。これら水溶性有機溶媒の核酸可溶化試薬溶液における濃度は1～20質量%であることが好ましい。

【0053】

また、上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、検体にカオトロピック塩およびタンパク質分解酵素とともに混合する界面活性剤は、例えば、ノニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、アニオン界面活性剤、両性界面活性剤である。

本発明においてはノニオン界面活性剤を好ましく用いることができる。ノニオン界面活性剤は、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤、脂肪酸アルカノールアミドを用いることができるが、好ましくは、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤を用いることができる、さらに好ましくは、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤は、POEデシルエーテル、POEラウリルエーテル、POEトリデシルエーテル、POEアルキレンデシルエーテル、POEソルビタンモノラウレート、POEソルビタンモノオレエート、POEソルビタンモノステアレート、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビット、POEアルキルアミン、POEアセチレングリコールから選択されるポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤である。

【0054】

また、カチオン界面活性剤も好ましく用いることができる。さらに好ましくは、カチオン界面活性剤は、セチルトリメチルアンモニウムプロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルピリジニウムクロリドから選択されるカチオン界面活性剤である。これらの界面活性剤は、単独または複数組み合わせ用いてもよい。

これら界面活性剤の核酸可溶化試薬溶液における濃度は0.1～20質量%であることが好ましい。

【0055】

DNAなどRNA以外の核酸を回収する場合、上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、核酸可溶化試薬溶液にRNA分解酵素を加えることが好ましい。この場合、回収された核酸に共存するRNAに

よる干渉を軽減することができる。また、DNA分解酵素阻害剤を加えることも好ましい。

一方、RNAなどDNA以外の核酸を回収する場合、核酸可溶化試薬溶液にDNA分解酵素を加えることが好ましい。この場合、回収された核酸に共存するDNAによる干渉を軽減することができる。また、RNA分解酵素阻害剤を加えることも好ましい。RNA分解酵素阻害剤としては、RNA分解酵素を特異的に阻害するものが好ましい。RNA分解酵素は特に限定されず、例えば、リボヌクレアーゼ H (RNase H) 等のRNA特異的分解酵素を好ましく用いることができる。DNA分解酵素は特に限定されず、例えば、DNase I 等のDNA特異的分解酵素を好ましく用いることができる。核酸分解酵素および核酸分解酵素阻害剤は、通常用いられる濃度で用いることができる。また、通常どおり加温処理することができる。加温処理は、タンパク質分解酵素による処理と同時に行うことが好ましい。

【0056】

上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、インキュベートされた混合液に添加する水溶性有機溶媒は、アルコールを好ましく用いることができる。アルコールは、1級アルコール、2級アルコール、3級アルコールのいずれでもよく、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール、ブチルアルコール及びその異性体を好ましく用いることができる。これら水溶性有機溶媒の核酸を含む試料溶液における最終濃度は、5～90質量%であることが好ましい。

【0057】

上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、核酸を含む試料溶液には、消泡剤を含有させることも好ましい。上記消泡剤としては、シリコン系消泡剤とアルコール系消泡剤の2つの成分が好ましく挙げられ、また、アルコール系消泡剤としては、アセチレングリコール系界面活性剤が好ましい。

【0058】

消泡剤の具体例としては、シリコン系消泡剤（例えば、シリコンオイル、ジメチルポリシロキサン、シリコンエマルジョン、変性ポリシロキサン、シリコンコンパウンドなど）、アルコール系消泡剤（例えば、アセチレングリコール、ヘプタノール、エチルエキサノール、高級アルコール、ポリオキシアルキレングリコールなど）、エーテル系消泡剤（例えば、ヘプチルセロソルブ、ノニルセロソルブー3-ヘプチルコルビトールなど）、油脂系消泡剤（例えば、動植物油など）、脂肪酸系消泡剤（例えば、ステアリン酸、オレイン酸、パルミチン酸など）、金属セッケン系消泡剤（例えば、ステアリン酸アルミ、ステアリン酸カルシウムなど）、脂肪酸エステル系消泡剤（例えば、天然ワックス、トリブチルホスフェートなど）、リン燐酸エステル系消泡剤（例えば、オクチルリン酸ナトリウムなど）、アミン系消泡剤（例えば、ジアミルアミンなど）、アミド系消泡剤（例えば、ステアリン酸アミドなど）、その他の消泡剤（例えば、硫酸第二鉄、ボーキサイトなど）などが挙げられる。特に好ましくは、消泡剤として、シリコン系消泡剤とアルコール系消泡剤の2つの成分を組み合わせて使用することができる。また、アルコール系消泡剤としては、アセチレングリコール系界面活性剤を使用することも好ましい。

【0059】

また、上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、得られた核酸を含む試料溶液は、表面張力は50 dyne/cm以下であることが好ましく、また、粘度は、1～1000 mPaであることが好ましく、比重は、0.8～1.2であることが好ましい。

【0060】

以下に、本発明で用いる核酸吸着性多孔性膜および吸着工程について説明する。本発明の核酸吸着性多孔性膜は、溶液が内部を通過可能なものである。ここで「溶液が内部を通過可能」とは、膜の一方の面が接する空間と膜の他方の面が接する空間の間に圧力差を生

じさせた場合に、高圧の空間側から低圧の空間側へと、膜の内部を溶液が通過することが可能であることを意味する。または、膜に遠心力を掛けた場合に、遠心力の方向に、膜の内部を溶液が通過することが可能であることを意味する。

【0061】

本発明の核酸吸着性多孔性膜は、平均孔径 $0.9 \sim 5.0 \mu\text{m}$ の多孔性膜であることを特徴とする。好ましくは、平均孔径 $1.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$ の多孔性膜である。本発明における多孔性膜の平均孔径は、ASTM F316-70に準拠した限外泡圧法(バブルポイント法)により測定した孔径で示す。平均孔径が $0.9 \mu\text{m}$ よりも小さいと、全血、培養細胞、組織などの固形分が多い試料を前処理して得られた核酸を含む試料溶液を多孔性膜を通過させた場合に通過時間が格段に大きくなり、また多孔性膜が目詰まりを起こしてしまう。また、平均孔径が $5.0 \mu\text{m}$ より大きいと、核酸が吸着できる表面積が減少し、十分な量の核酸が回収できない。

かかる平均孔径は、例えば多孔質化に際して適宜製造条件を調整することにより、所望の平均孔径を得ることができる。例えば、アセチルセルロース等の膜を有機溶剤に溶解した液を平面上に流延し、有機溶剤を蒸発させることで多孔質化する場合には、有機溶剤の組成、蒸発条件等を適宜コントロールすることにより、所望の平均粒径を有する多孔質膜を得ることができる。

【0062】

また、本発明の核酸吸着性多孔性膜は、イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜であることを特徴とする。これは、多孔性膜側の使用条件で「イオン化」していないことを意味し、環境の極性を変化させることで、核酸と多孔性膜が引き合うようになると推定される。これにより分離性能に優れ、しかも洗浄効率よく、核酸を単離精製することができる。好ましくは、核酸吸着性多孔性膜は、親水基を有する多孔性膜であり、環境の極性を変化させることで、酢酸と多孔性膜の親水基同士が引きあうようになると推定される。ここで、親水基を有する多孔性膜とは、多孔性膜を形成する材料自体が、親水性基を有する多孔性膜、または多孔性膜を形成する材料を処理またはコーティングすることによって親水基を導入した多孔性膜を意味する。多孔性膜を形成する材料は有機物、無機物のいずれでも良い。例えば、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する有機材料である多孔性膜、親水基を持たない有機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基を持たない有機材料の多孔性膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する無機材料である多孔性膜、親水基を持たない無機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基を持たない無機材料の多孔性膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜などを使用することができるが、加工の容易性から、多孔性膜を形成する材料は有機高分子などの有機材料を用いることが好ましい。

【0063】

親水基とは、水との相互作用を持つことができる有極性の基(原子団)を指し、核酸の吸着に関与する全ての基(原子団)が当てはまる。親水基としては、水との相互作用の強さが中程度のもの(化学大事典、共立出版株式会社発行、「親水基」の項の「あまり親水性の強くない基」参照)が良く、例えば、水酸基、カルボキシル基、シアノ基、オキシエチレン基などを挙げることができる。好ましくは水酸基である。

【0064】

親水基を有する多孔性膜としては、水酸基を有する有機材料の多孔性膜を挙げることができる。水酸基を有する有機材料としては、特開 2003-128691 号公報に記載の、アセチルセルロースの表面酸化物が挙げられる。アセチルセルロースとしては、モノアセチルセルロース、ジアセチルセルロース、トリアセチルセルロースの何れでもよいが、特にはトリアセチルセルロースが好ましい。この場合、酸化处理の程度(酸化率)で固相表面の水酸基の量(密度)をコントロールすることができる。核酸の分離効率を上げるためには、水酸基の量(密度)が多い方が好ましい。例えば、トリアセチルセルロースなどのアセチルセルロースの場合には、酸化率(表面酸化率)が約 5% 以上であることが好まし

く、10%以上であることが更に好ましい。また、水酸基を有する有機高分子の表面積を大きくするために、アセチルセルロースの多孔性膜を鹸化処理することが好ましい。この場合、多孔性膜は、表裏対称性の多孔性膜であってもよいが、裏非対称性の多孔性膜を好ましく使用することができる。

【0065】

鹸化処理とは、アセチルセルロースを鹸化処理液(例えば水酸化ナトリウム水溶液)に接触させることを言う。これにより、鹸化処理液に接触したアセチルセルロースの部分に、再生セルロースとなり水酸基が導入される。

鹸化率を変えるには、水酸化ナトリウムの濃度を変えて鹸化処理を行えば良い。鹸化率は、NMR、IR又はXPSにより、容易に測定することができる(例えば、カルボニル基のピーク減少の程度で定めることができる)。

【0066】

水酸基を有する有機材料の多孔性膜としては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物などで、形成された多孔性膜を挙げることができるが、特に多糖構造を有する有機材料の多孔性膜を好ましく使用することができる。

【0067】

特に、水酸基を有する有機材料の多孔性膜としては、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の多孔性膜を好ましく使用することができる。アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物として、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物を好ましく使用する事ができる。

特にトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物を好ましく使用することができる。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比(質量比)は、99:1~50:50である事が好ましい。

【0068】

また、水酸基を有する有機材料の多孔性膜としては、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理した有機材料からなる多孔性膜を好ましく用いることができる。アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理した有機材料としては、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物の鹸化物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の鹸化物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の鹸化物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の鹸化物も好ましく使用する事ができる。特に、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物の鹸化物を好ましく使用することができる。

トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比(質量比)は、99:1~50:50である事が好ましい。

【0069】

また、水酸基を有する有機材料の多孔性膜としては、セルロースの多孔性膜を好ましく使用する事ができる。セルロースの多孔性膜としては、再生セルロースの多孔性膜を好ましく使用する事ができる。再生セルロースとは、アセチルセルロースの固体の表面または全体を、鹸化処理によりセルロース化したもので、本来のセルロースとは、結晶状態等の点で異なっている。

【0070】

親水基を持たない有機材料の多孔性膜に親水基を導入する方法として、ポリマー鎖内または側鎖に親水基を有すグラフトポリマー鎖を多孔性膜に結合することができる。

有機材料の多孔性膜にグラフトポリマー鎖を結合する方法としては、多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法と、多孔性膜を起点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させグラフトポリマー鎖とする2つの方法がある。

【0071】

まず、多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合にて付着させる方法においては、ポリマーの末端または側鎖に多孔性膜と反応する官能基を有するポリマーを使用し、この官能基と、多孔性膜の官能基とを化学反応させることでグラフトさせることができる。多孔性膜と反応する官能基としては、多孔性膜の官能基と反応し得るものであれば特に限定はないが、例えば、アルコキシシランのようなシランカップリング基、イソシアネート基、アミノ基、水酸基、カルボキシル基、スルホン酸基、リン酸基、エポキシ基、アリル基、メタクリロイル基、アクリロイル基等を挙げることができる。

【0072】

ポリマーの末端、または側鎖に反応性官能基を有するポリマーとして特に有用な化合物は、トリアルコキシシリル基をポリマー末端に有するポリマー、アミノ基をポリマー末端に有するポリマー、カルボキシル基をポリマー末端に有するポリマー、エポキシ基をポリマー末端に有するポリマー、イソシアネート基をポリマー末端に有するポリマーが挙げられる。この時に使用されるポリマーとしては、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、具体的には、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレンなどを挙げることができる。

【0073】

多孔性膜を基点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させ、グラフトポリマー鎖を形成させる方法は、一般的には表面グラフト重合と呼ばれる。表面グラフト重合とは、プラズマ照射、光照射、加熱などの方法で基材表面上に活性種を与え、多孔性膜と接するように配置された重合可能な二重結合を有する化合物を重合によって多孔性膜と結合させる方法を指す。基材に結合しているグラフトポリマー鎖を形成するのに有用な化合物は、重合可能な二重結合を有しており、核酸の吸着に関与する親水基を有するという、2つの特性を兼ね備えていることが必要である。これらの化合物としては、分子内に二重結合を有していれば、親水基を有するポリマー、オリゴマー、モノマーのいずれの化合物をも用いることができる。特に有用な化合物は親水基を有するモノマーである。

【0074】

特に有用な親水基を有するモノマーの具体例としては、次のモノマーを挙げることができる。例えば、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、グリセロールモノメタクリレート等の水酸性基含有モノマーを特に好ましく用いることができる。また、アクリル酸、メタアクリル酸等のカルボキシル基含有モノマー、もしくはそのアルカリ金属塩及びアミン塩も好ましく用いることができる。

【0075】

親水基を持たない有機材料の多孔性膜に親水基を導入する別の方法として、親水基を有する材料をコーティングすることができる。コーティングに使用する材料は、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、作業の容易さから有機材料のポリマーが好ましい。ポリマーとしては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物などを挙げることができるが、多糖構造を有するポリマーが好ましい。

【0076】

また、親水基を持たない有機材料の多孔性膜に、アセチルセルロースまたは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物をコーティングした後に、コーティングしたアセチルセルロースまたは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理することもできる。この場合、鹸化率が約5～100%であることが好ましい。さらには、鹸化率が約10～100%であることが好ましい。

【0077】

親水基を有する無機材料である多孔性膜としては、シリカ化合物を含有する多孔性膜を挙げることができる。シリカ化合物を含有する多孔性膜としては、ガラスフィルターを挙げることができる。また、特許公報第3058342号に記載されているような、多孔質のシリカ薄膜を挙げることができる。この多孔質のシリカ薄膜とは、二分子膜形成能を有するカチオン型の両親媒性物質の展開液を基板上に展開した後、基板上の液膜から溶媒を除去することによって両親媒性物質の多層二分子膜薄膜を調整し、シリカ化合物を含有する溶液に多層二分子膜薄膜を接触させ、次いで前記多層二分子膜薄膜を抽出除去することで作製することができる。

【0078】

親水基を持たない無機材料の多孔性膜に親水基を導入する方法としては、多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法と、分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを使用して、多孔性膜を起点として、グラフトポリマー鎖を重合する2つの方法がある。

多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合にて付着させる場合は、グラフトポリマー鎖の末端の官能基と反応する官能基を無機材料に導入し、そこにグラフトポリマーを化学結合させる。また、分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを使用して、多孔性膜を起点として、グラフトポリマー鎖を重合する場合は、二重結合を有する化合物を重合する際の起点となる官能基を無機材料に導入する。親水性基を持つグラフトポリマー、および分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーとしては、上記、親水基を持たない有機材料の多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法において、記載した親水性基を持つグラフトポリマー、および分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを好ましく使用することができる。

【0079】

親水基を持たない無機材料の多孔性膜に親水基を導入する別の方法として、親水基を有する材料をコーティングすることができる。コーティングに使用する材料は、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、作業の容易さから有機材料のポリマーが好ましい。ポリマーとしては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物などを挙げることができる。

【0080】

また、親水基を持たない無機材料の多孔性膜に、アセチルセルロースまたは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物をコーティングした後に、コーティングしたアセチルセルロースまたは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理することもできる。この場合、鹸化率が約5%以上であることが好ましい。さらには、鹸化率が約10%以上であることが好ましい。

【0081】

親水基を持たない無機材料の多孔性膜としては、アルミニウム等の金属、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックス、もしくはニューセラミックス、シリコン、活性炭等を加工して作製した多孔性膜を挙げることができる。

【0082】

核酸分離精製カートリッジは、少なくとも二個の開口を有する容器内に、上記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を収容する以外、その他の部材を収容していないことが好ましい。上記の容器の材料としては、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニルなどのプラスチックを使用することができる。また、生分解性の材料も好ましく使用することができる。また、上記の容器は透明であっても、着色してあっても良い。

【0083】

核酸分離精製カートリッジとして、個々の核酸分離精製カートリッジを識別する手段を

備えている核酸分離精製カートリッジを使用する事ができる。個々の核酸分離精製カートリッジを識別する手段としては、バーコード、磁気テープなどが挙げられる。

【0084】

また、少なくとも二個の開口を有する容器内から核酸吸着性多孔性膜を容易に取り出す事が可能になっている構造を有した核酸分離精製カートリッジを使用することもできる。

【0085】

上記に記載した、各々の溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を収容する核酸分離精製カートリッジを用いて、以下の工程で核酸を分離精製することができる。

すなわち、(a)核酸を含む試料溶液を、少なくとも二個の開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に注入する工程、(b)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、(c)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に洗浄液を注入する工程、(d)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、(e)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液を注入する工程、(f)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内から核酸を脱着させ、核酸分離精製カートリッジ容器外に排出する工程が挙げることができる。

【0086】

また、別の態様としては、(a)核酸を含む試料溶液を、少なくとも二個の開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に注入する工程、(b)核酸分離精製カートリッジの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を減圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、核酸分離精製カートリッジの上記他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、(c)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に洗浄液を注入する工程、(d)核酸分離精製カートリッジの上記他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を減圧状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、上記他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、(e)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液を注入する工程、(f)核酸分離精製カートリッジの上記他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を減圧状態にし、又は核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させ、注入した回収液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、上記他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内から核酸を脱着させ、核酸分離精製カートリッジ容器外に排出する工程をおこなうことができる。

【0087】

また、別の核酸分離精製工程としては、(a)核酸を含む試料溶液を、少なくとも二個の開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に注入する工程、(b)核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させ、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、(c)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に洗浄液を注入する工程、(d)核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させ、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、(e)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液

を注入する工程、(f)核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させ、注入した回収液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内から核酸を脱着させ、核酸分離精製カートリッジ容器外に排出する工程を行うこともできる。

【0088】

以下、洗浄工程について説明する。洗浄を行うことにより、核酸の回収量及び純度が向上し、必要な核酸を含む検体の量を微量とすることができる。また、洗浄や回収操作を自動化することによって、操作が簡便かつ迅速に行うことが可能になる。洗浄工程は、迅速化のためには1回の洗浄で済ませてもよく、また純度がより重要な場合には複数回洗浄を繰り返すことが好ましい。

【0089】

洗浄工程において、洗浄液は、チューブ、ピペット、又は自動注入装置、もしくはこれらと同じ機能をもつ供給手段を使用して、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジへ供給される。供給された洗浄液は、核酸分離精製カートリッジの一の開口（核酸を含む試料溶液を注入した開口）から供給され、該開口に結合された圧力差発生装置（例えばスポイド、注射器、ポンプ、パワーピペットなど）を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にして核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させることができる。また、洗浄液を一の開口から供給し、同じ一の開口より排出させることもできる。さらには、核酸分離精製カートリッジの核酸を含む試料溶液を供給した一の開口と異なる開口より洗浄液を供給し、排出させることも可能である。しかしながら、核酸分離精製カートリッジの一の開口から供給し、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出する方法が洗浄効率が優れてより好ましい。

洗浄工程における洗浄液の液量は、 $2\mu\text{L}/\text{mm}^2$ 以上が好ましい。洗浄液量が多量であれば洗浄効果は向上するが、操作性を保ち、試料の流出を抑止するためには、 $200\mu\text{L}/\text{mm}^2$ 以下が好ましい。

【0090】

洗浄工程において、洗浄液を核酸吸着性多孔性膜を通過させる場合の流速は、膜の単位面積（ cm^2 ）あたり、 $2\sim 1500\mu\text{L}/\text{sec}$ であることが好ましく、 $5\sim 700\mu\text{L}/\text{sec}$ であることがより好ましい。通過速度を下げて時間を掛ければ洗浄がそれだけ十分に行なわれることになるが、核酸の分離精製操作の迅速化も重要であるので上記した範囲が選択される。

【0091】

洗浄工程において、洗浄液の液温は $4\sim 70^\circ\text{C}$ であることが好ましい。さらには、洗浄液の液温を室温とすることがより好ましい。また洗浄工程において、その核酸分離精製カートリッジを器械的な振動や超音波による攪拌を与えながら、または遠心分離により洗浄することもできる。

【0092】

洗浄工程において、洗浄液には、一般的には核酸分解酵素のような酵素を含ませないが、タンパク質等の夾雑物質を分解する酵素を含ませることができる。また、場合によってはDNA分解酵素、RNA分解酵素などを含ませることもできる。DNA分解酵素を含む洗浄液を使用することにより、検体中のRNAのみを選択的に回収することができる。逆に、RNA分解酵素を含む洗浄液を使用することにより、検体中のDNAのみを選択的に回収することができる。

【0093】

洗浄工程において、洗浄液は、水溶性有機溶媒及び/または水溶性塩を含んでいる溶液であることが好ましい。洗浄液は、核酸吸着性多孔性膜に核酸と共に吸着した試料溶液中の不純物を洗い流す機能を有する必要がある。そのためには、核酸吸着性多孔性膜から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成であることが必要である。この目的には、アルコール等の水溶性有機溶媒が核酸が難溶性であるので、核酸を保持したまま核酸以外の成分を脱着させるのに適している。また、水溶性塩を添加することにより、核酸の吸着効

果が高まるので、不要成分の選択的除去作用が向上する。

【0094】

洗浄液に含まれる水溶性有機溶媒としては、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール及びその異性体、ブチルアルコール及びその異性体などのアルコールを用いることができ、中でもエタノールを用いることが好ましい。洗浄液中に含まれる水溶性有機溶媒の量は、20～100質量%であることが好ましく、40～60質量%であることがより好ましい。

【0095】

一方、洗浄液に含まれる水溶性塩は、ハロゲン化物の塩であることが好ましく、中でも塩化物が好ましい。また、水溶性塩は、一価または二価のカチオンであることが好ましく、特にアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩が好ましく、中でもナトリウム塩及びカリウム塩が好ましくナトリウム塩が最も好ましい。

水溶性塩が洗浄液中に含まれる場合、その濃度は10 mM/L以上であることが好ましく、その上限は不純物の溶解性を損なわない範囲であれば特に問わないが、1 M/L以下であることが好ましく、0.1 M/L以下であることがより好ましい。

とりわけ、水溶性塩が塩化ナトリウムであり、さらには、塩化ナトリウムが20 mM/L以上含まれていることが特に好ましい。

【0096】

洗浄液は、カオトロピック物質を含んでいないことが好ましい。それによって、洗浄工程に引き続く回収工程にカオトロピック物質が混入する可能性を減らすことができる。回収工程時に、カオトロピック物質が混入すると、しばしばPCR反応等の酵素反応を阻害するので、後の酵素反応等を考慮すると洗浄液にカオトロピック物質を含まないことが理想的である。また、カオトロピック物質は、腐食性で有害であるので、この点でもカオトロピック物質を用いないで済むことは、実験者にとっても試験操作の安全上極めて有利である。

ここで、カオトロピック物質とは、前記したように尿素、グアニジン塩、イソチアン酸ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウムなどである。

【0097】

従来、核酸分離精製工程における洗浄工程の際、洗浄液がカートリッジなどの容器に対する濡れ性が高いため、しばしば洗浄液が容器中に残留することになり、洗浄工程に続く回収工程への洗浄液の混入して核酸の純度の低下や次工程における反応性の低下などの原因となっている。したがって、カートリッジなどの容器を用いて核酸の吸着及び脱着を行う場合、吸着、洗浄時に用いる液、特に洗浄液が、次の工程に影響を及ぼさないように、カートリッジ内に洗浄残液が残留しないことは重要である。

【0098】

したがって、洗浄工程における洗浄液が次工程の回収液に混入することを防止して、洗浄液のカートリッジ内への残留を最小限に留めるため、洗浄液の表面張力を35 dyne/cm未満にすることが好ましい。表面張力を低くすれば洗浄液とカートリッジの濡れ性が向上し、残留する液量を抑えることができる。

【0099】

逆に、洗浄工程における洗浄液のカートリッジへの残留を減少させる目的で、洗浄液の表面張力を35 dyne/cm以上にして、カートリッジとの撥水性を高めて液滴を形成させ、その液滴が流れ落ちることによって残留する液量を抑えることもできる。核酸を吸着した多孔性膜、回収液、洗浄液の組合せなどによっていずれかの表面張力が選択される。

。

【0100】

本発明に係る核酸吸着性多孔性膜を利用して洗浄工程を簡素化することができる。(1) 洗浄液が核酸吸着性多孔性膜を通過する回数を1回でよい、(2) 洗浄工程を室温でできる。(3) 洗浄後、直ちに回収液をカートリッジに注入することができる。(4) 前記(1)、(2)及び(3)のうちのいずれか1つもしくは2つ以上のも可能である。従来法においては、洗浄液中

に含まれる有機溶媒を迅速に取り除くため、しばしば乾燥工程を必要としたが、本発明に係る核酸吸着性多孔性膜は薄膜であるためにこれを省略できるからである。

【0101】

従来、核酸分離精製工程において、洗浄工程の際、しばしば洗浄液が飛散し他に付着することによって、試料のコンタミネーション（汚染）が起きることが問題となっている。洗浄工程におけるこの種のコンタミネーションは、二つの開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジと廃液容器の形状とを工夫することによって抑止することができる。

【0102】

以下に核酸吸着性多孔性膜から核酸を脱着させて回収する工程について示す。

回収工程において、回収液は、チューブ、ピペット、又は自動注入装置、もしくはこれらと同じ機能をもつ供給手段を使用して、核酸吸着性多孔性膜を装着した核酸分離精製カートリッジへ供給される。回収液は、核酸分離精製カートリッジの一の開口（核酸を含む試料溶液を注入した開口）から供給され、該開口に結合された圧力差発生装置（例えばスポイド、注射器、ポンプ、パワーピペットなど）を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にして核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させることができる。また、回収液を一の開口から供給し、同じ一の開口より排出させることもできる。さらには、核酸分離精製カートリッジの核酸を含む試料溶液を供給した一の開口と異なる開口より回収液を供給し、排出させることも可能である。しかしながら、核酸分離精製カートリッジの一の開口から供給し、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出する方法が回収効率が優れてより好ましい。

【0103】

検体から調整した核酸を含む試料溶液の体積に対して、回収液の体積を調整して核酸の脱着を行うことができる。分離精製された核酸を含む回収液量は、そのとき使用する検体量による。一般的によく使われる回収液量は数10から数100 μ lであるが、検体量が極微量である時や、逆に大量の核酸を分離精製したい場合には回収液量は1 μ lから数10mlの範囲で変える事ができる。

【0104】

回収液としては好ましくは精製蒸留水、Tris/EDTAバッファ等が使用できる。また、回収した核酸をPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）に供する場合、PCR反応において用いる緩衝溶液（例えば、KCl 50mmol/l、Tris-Cl 10mmol/l、MgCl₂ 1.5mmol/lを最終濃度とする水溶液）を用いることもできる。

【0105】

回収液のpHは、pH2～11であることが好ましい。さらには、pH5～9であることが好ましい。また特にイオン強度と塩濃度は吸着核酸の溶出に効果を及ぼす。回収液は、290mmol/L以下のイオン強度であることが好ましく、さらには、90mmol/L以下の塩濃度であることが好ましい。こうすることで、核酸の回収率が向上し、より多くの核酸を回収することができる。回収される核酸は1本鎖でもよく、2本鎖でも良い。

【0106】

回収液の体積を当初の核酸を含む試料溶液の体積と比較して少なくすることによって、濃縮された核酸を含む回収液を得ることができる。好ましくは、(回収液体積):(試料溶液体積)=1:100～99:100、更に好ましくは、(回収液体積):(試料溶液体積)=1:10～9:10にすることができる。これにより核酸分離精製後工程において濃縮のための操作をすることなく、簡単に核酸を濃縮できる。これらの方法により検体よりも核酸が濃縮されている核酸溶液を得る方法を提供できる。

【0107】

また別の方法としては、回収液の体積を当初の核酸を含む試料溶液よりも多い条件で核酸の脱着を行うことにより、希望の濃度の核酸を含む回収液を得ることができ、次工程（

PCRなど)に適した濃度の核酸を含む回収液を得ることができる。好ましくは、(回収液体積):(試料溶液体積)=1:1~50:1、更に好ましくは、(回収液体積):(試料溶液体積)=1:1~5:1にすることができる。これにより核酸分離精製後に濃度調整をする煩雑さがなくなるというメリットを得られる。更に、十分量の回収液を使用することにより、多孔性膜からの核酸回収率の増加を図ることができる。

【0108】

また、目的に応じて回収液の温度を変化させることで簡便に核酸を回収することができる。例えば、回収液の温度を0~10℃にして多孔性膜からの核酸の脱着を行うことで、酵素による分解を防止する何らかの試薬や特別な操作を加えることなく核酸分解酵素の働きを抑制して、核酸の分解を防ぎ、簡便に、効率よく核酸溶液を得ることができる。

【0109】

また、回収液の温度を10~35℃とした場合、一般的な室温で核酸の回収を実施することが出来、複雑な工程を必要とせずに核酸を脱着させて分離精製することができる。

【0110】

また別の方法としては、回収液の温度を高温、例えば35~70℃することで、多孔性膜からの核酸の脱着を煩雑な操作を経ず簡便に高い回収率で実施することができる。

【0111】

回収液の注入回数は限定されるものではなく、1回でも複数回でもよい。通常、迅速、簡便に核酸を分離精製する場合は、1回の回収で実施するが、大量の核酸を回収する場合等複数回にわたり回収液を注入する事がある。

【0112】

回収工程においては、核酸の回収液をその後の後工程に使用できる組成にしておくことが可能である。分離精製された核酸は、しばしばPCR(ポリメラーゼチェーンリアクション)法により増幅される。この場合、分離精製された核酸溶液はPCR法に適したバッファー液で希釈する必要がある。本方法による回収工程において、回収液にPCR法に適したバッファー液を用いることで、その後のPCR工程へ簡便、迅速に移行することができる。

【0113】

また、回収工程において、核酸の回収液に回収した核酸の分解を防ぐための安定化剤を添加しておくことも可能である。安定化剤としては、抗菌剤、抗カビ^{*}剤や核酸分解抑制剤などを添加することができる。核酸分解酵素の阻害剤としてはEDTAなどが上げられる。また別の実施態様として、回収容器にあらかじめ安定化剤を添加しておくこともできる。

【0114】

また、回収工程で用いられる回収容器には特に限定はないが、260nmの吸収が無い素材で作製された回収容器を用いることができる。この場合、回収した核酸溶液の濃度を、他の容器に移し替えずに測定できる。260nmに吸収のない素材は、例えば石英ガラス等が挙げられるがそれに限定されるものではない。

【0115】

上記の、少なくとも二つの開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力発生装置を用いて、核酸を含む検体から核酸を分離精製する工程は、工程を自動で行う自動装置を用いて行うことが好ましい。それにより、操作が簡便化および迅速化するだけでなく、作業者の技能によらず一定の水準の核酸を得ることが可能になる。

【実施例】

【0116】

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

(1) 核酸精製カートリッジの作成

内径 7 mm、核酸吸着性多孔膜を収容する部分を持つ核酸分離精製カートリッジ用容器をハイインパクトポリスチレンで作成する。アセチル化の異なるアセチルセルロースの混合物を鹼化処理した核酸吸着性多孔膜として、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が 6 : 4 の多孔性膜を鹼化処理した多孔膜（膜厚 = 70 μ m、平均孔径 = 2.5 μ m）を、上記の、核酸分離精製カートリッジ用容器の核酸吸着性多孔膜を収容する部分に収容し、核酸分離精製カートリッジとする。

【0117】

(2) 核酸可溶化試薬及び洗浄液の調製

表 1 に示す処方 of 核酸可溶化試薬溶液及び洗浄液を調製する。

【0118】

【表 1】

(核酸可溶化試薬溶液)

塩酸グアニジン (ライフテクノロジー社製)	382 g
Tris (ライフテクノロジー社製)	12.1 g
Triton X-100 (ICN 製)	10 g
蒸留水	1000 ml

(洗浄液)

100 mM NaCl	
10 mM Tris-HCl	
70% エタノール	

【0119】

(3) DNA 分離精製操作

人全血検体 200 μ l に、実施例 1 で作製した核酸可溶化試薬 200 μ l と、プロテアーゼ (SIGMA 社製、"Protease" Type XXIV Bacterial) 溶液 20 μ l を添加して、60℃ で 10 分間インキュベートする。インキュベート後、エタノール 200 μ l を加え攪拌することで、核酸を含む試料溶液を作製する。該核酸を含む試料溶液を、上記 (1) で作製した、アセチル化の異なるアセチルセルロースの混合物の核酸吸着性多孔膜を備えた、核酸分離精製カートリッジの一の開口に注入し、続いて上記一の開口に圧力発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した該核酸を含む試料溶液を、上記核酸吸着性多孔膜に通過させることで、上記核酸吸着性多孔膜に接触させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出する。この際、試料溶液が多孔膜を通過する時間を測定する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に、実施例 1 で作製した洗浄液を注入し、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に圧力発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、上記核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液を注入し、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に圧力発生装置を結合して、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、上記核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収する。

【0120】

(3) DNA の回収量の確認

回収液を用いて UV 測定を行い、260 nm の吸光度 (OD) から、回収液中に含まれる DNA の量を求める。

【0121】

[実施例 2]

実施例 1 において、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が 6 : 4 の多孔性膜を鹼化処理した多孔膜（膜厚 = 70 μ m、平均孔径 = 1.2 μ m）を用いる以外は、実施例 1 と同じ操作を行い、試料溶液が多孔膜を通過する時間と、回収液中の DNA 量を求める。

【0122】

[比較例1]

実施例1において、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜を鹼化処理した多孔膜（膜厚=70 μ m、平均孔径=0.8 μ m）を用いる以外は、実施例1と同じ操作を行い、試料溶液が多項膜を通過する時間と、回収液中のDNA量を求める。

【0123】

[比較例2]

実施例1において、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜を鹼化処理した多孔膜（膜厚=70 μ m、平均孔径=5.6 μ m）を用いる以外は、実施例1と同じ操作を行い、試料溶液が多項膜を通過する時間と、回収液中のDNA量を求める。

【0124】

表2に、実施例1、実施例2、比較例1および比較例2で測定した値を示す。

【0125】

【表2】

	試料溶液が多孔膜を通過する時間(sec.)	回収DNA量(μ g)
実施例1	8	5.4
実施例2	15	5.6
比較例1	目詰まりにより通過不能	0.0
比較例2	6	3.4

【0126】

表2から、本発明の実施例1及び実施例2では、試料溶液が短時間で多孔膜を通過することができ、かつ十分量のDNAが回収できることがわかる。一方、比較例1では、多孔膜が試料溶液中の成分で目詰まりしてしまい、試料溶液が多孔膜を通過することができず、DNAを回収することが出来ない。また、比較例2では、試料溶液が短時間で多孔膜を通過することができるが、回収できるDNAの量が十分でない。

【0127】

[実施例3]

(1) 核酸精製カートリッジの作成

内径7mm、核酸吸着性多孔膜を収容する部分を持つ核酸分離精製カートリッジ用容器をハイインパクトポリスチレンで作成する。アセチル化の異なるアセチルセルロースの混合物を鹼化処理した核酸吸着性多孔膜として、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜を鹼化処理した多孔膜（膜厚=70 μ m、平均孔径=2.5 μ m）を、上記の、核酸分離精製カートリッジ用容器の核酸吸着性多孔膜を収容する部分に収容し、核酸分離精製カートリッジとする。

【0128】

(2) RNA可溶化試薬及び洗浄液の調整

表3に示す処方のRNA可溶化試薬溶液及び洗浄液を調製する。

【0129】

【表3】

(RNA可溶化試薬溶液)

塩酸グアニジン (ライフテクノロジー社製)	382 g
Tris (ライフテクノロジー社製)	12.1 g
NP-40 (和光純薬製)	10 g
蒸留水	1000 ml

(洗浄液)

100 mM NaCl	
10 mM Tris-HCl	
56%エタノール	

【0130】

(3) RNA分離精製操作

ガン化人骨髄細胞 (HL60) 培養液を用意する。この培養液を細胞数が 1×10^6 個になるよう採取し、5分間遠心分離操作を行い、細胞を沈殿させ上澄みを除き、細胞を得る。上記HL60細胞 (1×10^6 個) にRNA可溶化試薬溶液 $200 \mu\text{l}$ を添加して攪拌、続いてエタノール $200 \mu\text{l}$ を加え攪拌することで、RNAを含む試料溶液を作製する。該RNAを含む試料溶液を、上記(1)で作製した、アセチル化の異なるアセチルセルロースの混合物の核酸吸着性多孔膜を備えた、核酸分離精製カートリッジの一の開口に注入し、続いて上記一の開口に圧力発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した該RNAを含む試料溶液を、上記核酸吸着性多孔膜に通過させることで、上記核酸吸着性多孔膜に接触させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出する。この際、試料溶液が多孔膜を通過する時間を測定する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に洗浄液を注入し、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に圧力発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、上記核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液を注入し、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に圧力発生装置を結合して、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、上記核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収する。

【0131】

(3) RNAの回収量の確認

回収液を用いてUV測定を行い、260nmの吸光度(OD)から、回収液中に含まれるRNAの量を求める。

【0132】

[比較例3]

実施例3において、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜を酸処理した多孔膜(膜厚=70 μm 、平均孔径=0.8 μm)を用いる以外は、実施例3と同じ操作を行い、試料溶液が多項膜を通過する時間と、回収液中のRNA量を求める。

【0133】

[比較例4]

実施例3において、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜を酸処理した多孔膜(膜厚=70 μm 、平均孔径=5.6 μm)を用いる以外は、実施例3と同じ操作を行い、試料溶液が多項膜を通過する時間と、回収液中のRNA量を求める。

【0134】

表4に、実施例3、比較例3および比較例4で測定した値を示す。

【0135】

【表 4】

	試料溶液が多孔膜を通過する時間(sec.)	回収RNA量(μ g)
実施例 3	16	9.6
比較例 3	目詰まりにより通過不能	0.0
比較例 4	9	6.5

【0136】

表 4 から、本発明の実施例 3 では、試料溶液が短時間で多孔膜を通過することができ、かつ十分量の RNA が回収できることがわかる。一方、比較例 3 では、多孔膜が試料溶液中の成分で目詰まりしてしまい、試料溶液が多孔膜を通過することができず、RNA を回収することが出来ない。

また、比較例 4 では、試料溶液が短時間で多孔膜を通過することができるが、回収できる RNA の量が十分でないことがわかる。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 核酸の回収量は十分に保ちながら、かつ多孔性膜を試料溶液が通過する時間が長くなり、あるいは、多孔性膜が目詰まりせずに、検体中の核酸を核酸吸着性の多孔性膜に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させて核酸を分離精製する。

【解決手段】 (1)核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、(2)洗浄液を該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、核酸が吸着した状態で該多孔性膜を洗浄する工程、及び(3)回収液を該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内から核酸を脱着させる工程を含有する核酸の分離精製方法において、該核酸吸着性多孔性膜が、イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜であって、その平均孔径が $0.9 \sim 5.0 \mu\text{m}$ であることを特徴とする核酸の分離精製方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 1 0 6 3 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 2 0 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地

氏 名

富士写真フイルム株式会社